

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3505 147 A 1

51 Int. Cl. 4:
C 12 N 5/00

21 Aktenzeichen: P 35 05 147.7
22 Anmeldetag: 15. 2. 85
43 Offenlegungstag: 23. 10. 86

Behördeneigentlich

DE 3505 147 A 1

71 Anmelder:
GCA Corp., Bedford, Mass., US

74 Vertreter:
Stellrecht, W., Dipl.-Ing. M.Sc.; Griesbach, D.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Haecker, W., Dipl.-Phys.;
Böhme, U., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 7000
Stuttgart

72 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

54 Verfahren und Vorrichtung zur gezielten Fusion von Zellen

Um ein Verfahren zur Elektrofusion von Zellen, bei dem die Zellen miteinander in Membrankontakt und mittels eines geeigneten Magnetfeldes fusioniert werden, zu schaffen, bei welchem in einfacher Weise eine gezielte Fusion zweier Zellen möglich ist, wird vorgeschlagen, daß die Zellen an einem ersten und an einem zweiten Träger fixiert werden, daß die beiden Träger so angeordnet werden, daß sich die auf diesen fixierten Zellen gegenüberliegen, daß die Zellen aufeinanderzu bewegt werden, so daß sich im wesentlichen Paare von Zellen bilden, die eine Zelle von dem ersten und eine Zelle von dem zweiten Träger umfassen, und daß die Zellen der Paare anschließend fusioniert werden.

DE 3505 147 A 1

HOEGER, STELLRECHT & PARTNER 3505147

P A T E N T A N W Ä L T E

UHLANDSTRASSE 14 c · D 7000 STUTTGART 1

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

Anmelderin: GCA Corporation
209 Burlington Road
Bedford, Mass. 01730
USA

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Elektrofusion von Zellen, bei welchem die Zellen miteinander in Membrankontakt gebracht und mittels eines geeigneten ^{Feld-} ~~Zell~~impulses fusioniert werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen an einem ersten und einem zweiten Träger fixiert werden, dass die beiden Träger so angeordnet werden, dass sich die auf diesen fixierten Zellen gegenüberliegen, dass die Zellen aufeinanderzu bewegt werden, so dass sich im wesentlichen Paare von Zellen bilden, welche eine Zelle von dem ersten und eine Zelle von dem zweiten Träger umfassen, und dass die Zellen der Paare anschliessend fusioniert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem ersten Träger Zellen einer Sorte A und auf dem zweiten Träger Zellen einer Sorte B fixiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass auf den Trägern so viele Zellen fixiert werden, dass eine Belegungsdichte von mindestens ungefähr 60 % einer Oberfläche der Träger erreicht wird.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche der Träger mit min-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 2 -

destens einer Schicht von Zellen der jeweiligen Zellsorte belegt wird.

5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen durch mechanisches Zusammenführen der Träger aufeinanderzu bewegt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Träger mechanisch bis auf einen geringen Abstand voneinander zusammengeführt werden, dass die Zellen von mindestens einem der Träger gelöst werden und dass die Zellen durch Dielektrophorese vollends zur Bildung von Paaren aufeinanderzu bewegt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Membran der Zellen mit ferromagnetischen Partikeln versehen wird, dass die Träger mechanisch bis auf einen geringen Abstand voneinander zusammengeführt werden und dass die Zellen durch ein äusseres Magnetfeld vollends zur Bildung von Paaren aufeinanderzu bewegt werden.
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zu einem Aufbringen der Zellen auf die Träger die Zellsuspension durch diese hindurchgesaugt wird.
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen durch Haftung in Poren der Träger fixiert werden.

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 3 -

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen durch elektrostatische Wechselwirkung auf den Trägern fixiert werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen durch Bildung mittels Antikörpern auf den Trägern fixiert werden.
12. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, mit zwei im Abstand voneinander angeordneten Elektroden, zwischen denen zur Elektrofusion erforderliche elektrische Felder erzeugbar sind, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Elektroden (34, 36) zwei Trägerelemente (68, 70) mit gegeneinander gerichteten und Zellen (80, 82) tragenden Oberflächen (86, 88) positionierbar sind, wobei die Oberflächen (86, 88) einen ersten Abstand voneinander aufweisen.
13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verstellvorrichtung (10) vorgesehen ist, mittels welcher die Oberflächen (86, 88) von einem zweiten, wesentlich grösseren Abstand bis auf den ersten Abstand aufeinanderzu bewegbar sind.
14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Abstand so gering ist, dass die Zellen (80, 82) an den Oberflächen (86, 88) der beiden Trägerelemente (68, 70) miteinander in Membrankontakt kommen.

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 4 -

15. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Abstand ungefähr einem Mehrfachen des Durchmessers der Zellen (80, 82) entspricht.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass Spulen (100, 102) zur Erzeugung quer zu den Oberflächen (86, 88) verlaufender magnetischer Felder vorgesehen sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerelemente (68, 70) Filter mit einer ungefähr dem Durchmesser der jeweils zu fusionierenden Zellen (80, 82) entsprechenden Porengrösse sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerelemente (68, 70) zum Fixieren der Zellen auf ihren Oberflächen (86, 88) ein Ionenaustauschermaterial tragen.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerelemente (68, 70) zum Fixieren der Zellen (80, 82) auf ihren Oberflächen (86, 88) für die jeweils zu fixierenden Zellen (80, 82) spezifische Antikörper tragen.

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

Anmelderin: GCA Corporation
209 Burlington Road
Bedford, Mass. 01730
USA

B e s c h r e i b u n g

Verfahren und Vorrichtung zur gezielten Fusion von Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Elektrofusion von Zellen, bei welchem die Zellen miteinander in Membrankontakt gebracht und mittels eines geeigneten Feldimpulses fusioniert werden.

Des weiteren betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens mit zwei im Abstand voneinander angeordneten Elektroden, zwischen denen zur Elektrofusion erforderliche elektrische Felder erzeugbar sind.

Bisher ist ein Verfahren zur Elektrofusion von Zellen bekannt, bei welchem diese in einer Zellsuspension durch Dielektrophorese im inhomogenen elektrischen Feld längs der Feldlinien in Form sogenannter Perlenketten aufgereiht werden. Danach wird ein geeigneter Feldimpuls appliziert, welcher Löcher im Bereich einer Membrankontaktzone zwischen jeweils zwei sich berührenden Zellen erzeugt, so dass es zu einer Brückenbildung zwischen den Membranen beider Zellen in der Membrankontaktzone kommt und schliesslich eine fusionierte Zelle entsteht.

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 6 -

Des weiteren ist noch ein Verfahren bekannt, bei dem eine Zellsuspension mit hoher Zelldichte verwendet wird, in welcher ebenfalls die zur Fusion notwendigen Feldimpulse appliziert werden, so dass die Membranen der Zellen durchlöchert werden und sich statistisch zwischen einzelnen Zellen in der Suspension Brücken bilden und folglich ebenfalls fusionierte Zellen entstehen.

Alle bekannten Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass die Zahl der miteinander fusionierenden Zellen nur sehr schwer oder überhaupt nicht kontrollierbar ist. Bei dem zuletzt genannten Verfahren, bei welchem sich statistisch Brücken zwischen den Membranen einzelner Zellen bilden, entstehen die Fusionsprodukte aus zwei oder mehreren Zellen entsprechend einer statistischen Verteilung und sind nur über die Konzentration der Zelldichte indirekt beeinflussbar. Es ist jedoch keinesfalls möglich, im wesentlichen nur Fusionsprodukte aus zwei Zellen herzustellen. Desgleichen ist auch beim zuerst genannten Verfahren die Länge der einzelnen Perlenketten nur indirekt beeinflussbar und es ist ebenfalls nicht möglich, das Verfahren so zu führen, dass eine überwiegende Zahl der Perlenketten nur aus zwei Zellen besteht, so dass Fusionsprodukte im wesentlichen nur aus zwei miteinander fusionierten Zellen entstehen.

Bei der Anwendung der Elektrofusion in biotechnologischen Verfahren ist es jedoch in zunehmendem Masse erforderlich, eine möglichst grosse Zahl von Fusionsprodukten gezielt herzustellen, d.h. gezielt eine genau definierte Zahl von Zellen miteinander zu fusionieren. Dies ist vor allem deshalb notwendig,

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 7 -

weil es nach der Zellfusion sehr schwierig ist, zu unterscheiden, ob das Fusionsprodukt genau die gewünschte Zahl fusionierter Zellen umfasst oder ob unerwünschterweise mehr oder weniger Zellen als beabsichtigt miteinander fusioniert wurden.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren der gattungsgemässen Art zu schaffen, bei welchem in einfacher Weise eine gezielte Fusion zweier Zellen möglich ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss bei einem Verfahren der eingangs beschriebenen Art dadurch gelöst, dass die Zellen an einem ersten und einem zweiten Träger fixiert werden, dass die beiden Träger so angeordnet werden, dass sich die auf diesen fixierten Zellen gegenüberliegen, dass die Zellen aufeinanderzu bewegt werden, so dass sich im wesentlichen Paare von Zellen bilden, welche eine Zelle von dem ersten und eine Zelle von dem zweiten Träger umfassen, und dass die Zellen der Paare anschliessend fusioniert werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren hat den Vorteil, dass durch die auf den Trägern fixierten Zellen und das anschliessende Aufeinanderzubewegen im wesentlichen nur Paare von Zellen hergestellt werden können, so dass nach der Fusion nahezu nur Fusionsprodukte vorliegen, die aus jeweils einem derartigen Paar bestehen. Dabei beschränkt sich dieses Verfahren selbstverständlich nicht auf die Herstellung von Fusionsprodukten aus nur zwei Zellen, sondern es kann beispielsweise nach der Fusion zweier Zellen das Fusions-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 3 -

produkt auf einem Träger fixiert bleiben und auf dem anderen Träger eine weitere Zelle fixiert werden, die anschliessend mit dem nach der ersten Fusion entstandenen Fusionsprodukt wiederum fusioniert werden kann, so dass das neue Fusionsprodukt sich aus drei Zellen zusammensetzt. Damit hat man die Möglichkeit, in gezielter Weise eine beliebige Zahl von Zellen miteinander zu fusionieren.

Besonders interessant ist das erfindungsgemässe Verfahren, wenn zwei unterschiedliche Zellen miteinander fusioniert werden sollen. Beispielsweise ist hier an die Herstellung von Hybridomzellen zu denken. Eine derartige Fusion zweier unterschiedlicher Zellen ist bei den eingangs beschriebenen, bereits bekannten Verfahren in gezielter Weise überhaupt nicht möglich, da jeweils nur mit einer Zellsuspension gearbeitet werden kann, in der die beiden unterschiedlichen Zellen zwar in einem bestimmten Verhältnis, jedoch in statischer Verteilung vorliegen. Das Verfahren ist durch keinen äusseren Parameter so beeinflussbar, dass nur jeweils Zellen unterschiedlicher Art miteinander fusionieren, d.h. beispielsweise, dass sich Perlenketten aus Zellen einer Sorte A und einer Sorte B zusammensetzen. Aus diesem Grund ist bei einem besonders vorteilhaften Ausführungsbeispiel des erfindungsgemässen Verfahrens daran gedacht, dass auf dem ersten Träger Zellen einer Sorte A und auf dem zweiten Träger Zellen einer Sorte B fixiert werden. Damit lassen sich zum einen Fusionsprodukte mit der Konfiguration A-A oder B-B und zum anderen Fusionsprodukte aus mehr als zwei Zellen im wesentlichen vermeiden.

Um eine ausreichend hohe Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung von Fusionsprodukten aus den Zellen auf dem ersten Träger und den Zellen auf dem zweiten Träger zu erreichen,

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

sollte einer Zelle auf dem ersten Träger mit grosser Wahrscheinlichkeit eine Zelle auf dem zweiten Träger gegenüberliegen, die dann zu einem Paar zusammengeführt werden können, so dass es zweckmässig ist, wenn auf den Trägern so viele Zellen fixiert werden, dass eine Belegungsdichte von mindestens ungefähr 60 % einer Oberfläche der Träger erreicht wird.

Wenn jedoch sichergestellt werden soll, dass auf jeden Fall einer Zelle auf dem ersten Träger eine Zelle auf dem zweiten Träger gegenüberliegt, kann dies auch dadurch erreicht werden, dass die Oberfläche der Träger mit mindestens einer Schicht von Zellen der jeweiligen Zellsorte belegt wird.

Das Zusammenführen der auf den einander gegenüberliegenden Trägern angeordneten Zellen ist auf verschiedene Art und Weise möglich.

Ein Ausführungsbeispiel sieht vor, dass die Zellen durch mechanisches Zusammenführen der Träger aufeinanderzu bewegt werden, so dass die auf den Oberflächen der Träger angeordneten Zellen gegeneinander gedrückt und dadurch für die Fusion in Membrankontakt miteinander gebracht werden. Der Vorteil dieser Lösung ist darin zu sehen, dass zur Herstellung des Membrankontakts keine zusätzlichen Massnahmen erforderlich sind und somit auch die mit diesen zusätzlichen Massnahmen verbundenen Probleme nicht auftreten. Beispielsweise bringt die Verwendung der Dielektrophorese für das Zusammenführen der Zellen stets eine unerwünschte und für die Zellen schädliche Erwärmung der Zellsuspension aufgrund des für die Dielektrophorese notwendigen elektrischen Wechselfeldes mit sich. Aber auch ein Zusammenführen der Zellen durch

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 10 -

Magnetfelder hat Nachteile, die sich in einem verschlechterten Wachstum der fusionierten Zellen aufgrund der auf der Membran haftenden Magnetpartikel äussern.

Eine weitere Möglichkeit zum Zusammenführen der Zellen besteht darin, dass die Träger mechanisch bis auf einen geringen Abstand voneinander zusammengeführt werden, dass die Zellen von mindestens einem der Träger gelöst werden und dass die Zellen durch Dielektrophorese vollends zur Bildung von Paaren aufeinanderzu bewegt werden. Dieses Ausführungsbeispiel hat den Vorteil, dass die Zellen nicht wie beim mechanischen Zusammenführen teilweise einem grossen mechanischen Druck ausgesetzt und dadurch gequetscht und geschädigt werden, sondern dass sie durch die Dielektrophorese in leichtem Membrankontakt miteinander gehalten werden. Die Erwärmung der Zellsuspension durch Dielektrophorese ist bei dieser Verfahrensführung deshalb nicht sehr gross, weil die Zellen bereits durch das mechanische Zusammenführen in geringem Abstand einander gegenüberliegen, so dass das Wechselfeld für die Dielektrophorese nur für kurze Zeiten angelegt werden muss und daher auch nur eine unwesentliche Erwärmung auftritt.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel sieht vor, dass eine Membran der Zellen mit ferromagnetischen Partikeln versehen wird, dass die Träger mechanisch bis auf einen geringen Abstand voneinander zusammengeführt werden und dass die Zellen durch ein äusseres Magnetfeld vollends zur Bildung von Paaren aufeinanderzu bewegt werden. Auch hierbei werden die Zellen nicht wie beim vollständigen mechanischen Zusammenführen gequetscht und einem mechanischen Druck ausgesetzt und es kann jegliche Erwärmung im Gegensatz zur Dielektrophorese vermieden werden, da die Zellen die letzte kurze Distanz bis

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 11 -

zur Bildung von Paaren durch ein äusseres Magnetfeld aufeinanderzu bewegt werden. Der einzige Nachteil dieser Methode ist darin zu sehen, dass durch das Versehen der Membran der Zellen mit ferromagnetischen Partikeln teilweise das Wachstum der fusionierten Zellen später gehemmt wird.

Welches der drei vorgenannten Ausführungsbeispiele für die jeweils zu fusionierenden Zellen Anwendung finden soll, ist von den Eigenschaften und Empfindlichkeiten dieser Zellen abhängig zu machen, da die Zellen auf die in Kauf zu nehmenden Nachteile bei jedem der drei Ausführungsbeispiele des Verfahrens in unterschiedlicher Weise ansprechen, so dass das geeignete Verfahren jeweils in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Zelltyps ausgewählt werden muss.

Bei den bisher beschriebenen Ausführungsbeispielen des erfindungsgemässen Verfahrens wurden im Detail noch keine Aussagen darüber gemacht, wie die Zellen auf den Träger aufgebracht und auf diesem fixiert werden können. Hierbei sind zunächst prinzipiell alle Möglichkeiten denkbar, durch welche die Zellen beim Fixieren und Aufbringen nicht geschädigt werden. Besonders zweckmässig ist es, wenn die Träger so ausgebildet sind, dass eine Flüssigkeit durch sie hindurchgesaugt werden kann, so dass zu einem Aufbringen der Zellen auf die Träger die Zellsuspension durch diese hindurchgesaugt wird und die Zellen auf der Oberfläche des Trägers haften bleiben.

Damit die Zellen jedoch nach dem Aufbringen auf die Oberfläche der Träger nicht sofort wieder durch Flüssigkeit von diesen abgespült werden, sollte eine Bindung zwischen den

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 12 -

Zellen auf der Oberfläche der Träger und den Trägern selbst erfolgen.

Dies ist dadurch möglich, dass die Zellen durch Haftung in Poren der Träger fixiert werden. Das Aufbringen der Zellen erfolgt dabei beispielsweise, wie oben beschrieben, durch Hindurchpumpen einer Zellsuspension durch die Träger, so dass sich die Zellen in den Poren auf der Oberfläche festsetzen. Ein derartiges Fixieren der Zellen auf dem Träger erlaubt sämtliche Methoden des Zusammenführens der beiden Träger, da die Zellen sowohl durch Dielektrophorese wie auch durch ein entsprechendes magnetisches Feld leicht aus den Poren der Träger herausgezogen und auf die gegenüberliegende Zelle zu bewegt werden können.

Ein anderes Ausführungsbeispiel des erfindungsgemässen Verfahrens sieht vor, dass die Zellen durch elektrostatische Wechselwirkung auf den Trägern fixiert werden. Dabei kann eine Belegung der Oberfläche entweder dadurch erfolgen, dass die Zellsuspension durch einen entsprechend ausgebildeten Träger hindurchgepumpt wird oder dass die Zellsuspension parallel zur Oberfläche an dem Träger vorbeiströmt und durch die elektrostatische Wechselwirkung die Zellen aus der Zellsuspension herausgezogen und auf den Trägern fixiert werden. Das mechanische Zusammenführen der beiden Träger ist bei einer derartigen Wechselwirkung ohne weiteres möglich, Probleme können jedoch dann entstehen, wenn das mechanische Zusammenführen zusätzlich mit Dielektrophorese oder mit einem magnetischen Zusammenführen der Zellen zu Paaren kombiniert ist, da dann die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Zellen und den Trägern so klein sein muss, dass die Zel-

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

len bei der Dielektrophorese oder bei dem magnetischen Zusammenführen trotzdem noch von einem der Träger gelöst werden können. Eine derartige Einstellung der Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung der Zellen mit dem Träger erfolgt bevorzugterweise durch geeignete Wahl des pH-Wertes in der Zellsuspension.

Schliesslich besteht auch noch die Möglichkeit, dass die Zellen durch Bindung mittels Antikörpern auf den Trägern fixiert werden. Auch hier ist ein mechanisches Zusammenführen der Zellen ohne weiteres möglich, jedoch muss ebenfalls bei einem kombinierten Zusammenführen der Zellen einerseits durch mechanisches Aufeinanderzubewegen der Träger und andererseits durch Dielektrophorese oder mittels magnetischer Felder sichergestellt werden, dass die Zellen durch die dabei auf diese ausgeübten Kräfte von zumindest einem der Träger ablösbar sind, d.h. dass die Bindungen zwischen den Zellen und den Antikörpern so schwach sind, dass sie von den Kräften aufgehoben werden können, die durch das bei der Dielektrophorese angewandte Wechselfeld oder das Magnetfeld entstehen.

Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens zu schaffen.

Diese Aufgabe wird bei einer Vorrichtung der eingangs beschriebenen Art erfindungsgemäss dadurch gelöst, dass zwischen den Elektroden zwei Trägerelemente mit gegeneinander gerichteten und Zellen tragenden Oberflächen positionierbar sind, wobei die Oberflächen einen ersten Abstand voneinander auf-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 14 -

weisen. Vorteilhaft bei dieser Vorrichtung ist, dass sie erlaubt, das eingangs beschriebene erfindungsgemässe Verfahren in sehr einfacher Weise durchzuführen, wobei vor allem die zwischen die Elektroden positionierbaren Trägerelemente eine sehr einfache Möglichkeit bieten, in gezielter Weise Paare von Zellen zu erzeugen und zur Fusion zwischen den Elektroden zu placieren.

Dabei kann es zweckmässig sein, wenn eine Verstellvorrichtung vorgesehen ist, mittels welcher die Oberflächen von einem zweiten, wesentlich grösseren Abstand bis auf den ersten Abstand aufeinanderzu bewegbar sind, so dass die Trägerelemente zunächst mit einem grösseren zweiten Abstand in die Verstellvorrichtung eingesetzt werden können und anschliessend die Möglichkeit besteht, die Trägerelemente und dadurch auch die auf deren Oberfläche fixierten Zellen bis zu dem gewünschten ersten Abstand aufeinanderzu zu bewegen.

Wenn die Zellen mechanisch zu Paaren zusammengeführt werden sollen, ist es notwendig, dass der erste Abstand so gering ist, dass die Zellen an den Oberflächen der beiden Trägerelemente in Membrankontakt kommen, d.h. der erste Abstand richtet sich danach, welche Grösse die Zellen haben, und wie weit die auf den Oberflächen fixierten Zellen von diesen maximal abstehen.

Wenn vorgesehen ist, dass die Zellen zunächst durch mechanisches Zusammenführen in einem bestimmten Abstand voneinander angeordnet werden und das letzte Stück durch Dielektrophorese oder Magnetfelder aufeinanderzu bewegt werden, ist es vorteilhaft, wenn der erste Abstand ungefähr einem Mehrfachen

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x 35

- 15 -

des Durchmessers der Zellen entspricht, so dass nur diese geringe Strecke durch Dielektrophorese oder Zusammenführen mittels Magnetfeldern überbrückt werden muss. Weiterhin ist bei einem mechanischen Zusammenführen der Träger-elemente bis zu einem dem Durchmesser mehrerer Zellen entsprechenden ersten Abstand von Vorteil, dass es zur Herstellung einer Schicht aus Fusionsmedium zwischen den Träger-elementen, in welcher die Zellen schwimmend mittels elektrischen oder magnetischen Feldern bewegt werden können, nicht notwendig ist, diese Trägerelemente selbst oder mit-samt den Elektroden so auszugestalten, dass ein Behältnis entsteht, welches die Flüssigkeit zwischen den Trägerelementen hält, sondern dass bei einem derart geringen ersten Abstand der auf jedem Trägerelement noch haftende Flüssigkeits-film für die Ausbildung der Schicht aus Fusionsmedium aus-reicht.

Bei Anwendung der Dielektrophorese für das Zusammenführen der Zellen zu Paaren ist keine besondere Ausgestaltung der Vorrichtung notwendig, da das für die Dielektrophorese erforderliche Wechselfeld mittels derselben Elektroden erzeugt werden kann wie sie auch für die Erzeugung des für die Elektrofusion notwendigen Feldimpulses verwendet werden.

Beim Zusammenführen der Zellen mittels Magnetfeldern ist es notwendig, dass Spulen zur Erzeugung quer zu den Oberflächen verlaufender magnetischer Felder vorgesehen sind, wobei vorteilhafterweise Feldlinien dieser magnetischen Felder im wesentlichen senkrecht zur Oberfläche der Träger-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 16 -

elemente verlaufen, damit die Zellen von einem Trägerelement auf die gegenüberliegenden Zellen des anderen Trägerelements zu bewegt werden und kein Bewegen der Zellen parallel zu den Oberflächen der Trägerelemente erfolgt.

Wenn eine Fixierung der Zellen auf der Oberfläche der Trägerelemente in den Poren dieser Trägerelemente erfolgen soll, ist es vorteilhaft, wenn die Trägerelemente Filter mit einer dem Durchmesser der jeweils zu fusionierenden Zellen entsprechenden Porengrösse sind, da diese Materialien einerseits erlauben, Feldsuspension zum Aufbringen der Zellen auf die Trägerelemente durch diese hindurchzusaugen, so dass ein einfaches Belegen der Trägerelemente mit Zellen möglich ist, und andererseits nur die Zellen oder Partikel, die ungefähr der Zellgrösse entsprechen, sich in den Poren festsetzen und in diesen formschlussähnlich gehalten sind.

Der Nachteil einer Fixierung der Zellen in den Poren auf der Oberfläche der Trägerelemente ist jedoch hauptsächlich darin zu sehen, dass beim Hindurchsaugen neben den Zellen, wie bereits beschrieben, auch Schmutzpartikel sich in den Poren festsetzen, so dass bei einer Zellsuspension, die neben den Zellen vergleichbar grosse derartige Partikel enthält, eine hohe Belegungsdichte der Oberfläche der Trägerelemente mit Zellen nicht erreichbar ist. Aus diesem Grund ist es beispielsweise von Vorteil, wenn die Trägerelemente zum Fixieren der Zellen auf ihren Oberflächen ein Ionenaustauschermaterial tragen. Ein derartiges Material ist ebenfalls einfach und billig zu beschaffen und bietet andererseits die Möglichkeit, dass aufgrund der weit spezifi-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 17 -

scheren Wechselwirkung zwischen den Trägerelementen und den Zellen auch bei mit Schmutzteilen befrachteter Zellsuspension eine hohe Belegungsdichte auf den Oberflächen erreicht werden kann, da zumindest ein Teil der Schmutzpartikel durch das Ionenaustauschermaterial nicht an die Oberfläche der Trägerelemente gebunden wird. Ausserdem hat eine derartige Ausführung der Trägerelemente noch den Vorteil, dass es nicht unbedingt notwendig ist, die Trägerelemente aus einem porösen Material herzustellen, durch das zum Belegen von deren Oberfläche mit Zellen die Zellsuspension hindurchgesaugt werden muss, sondern dass man auch beispielsweise die Möglichkeit hat, die Zellsuspension parallel zur Oberfläche der Trägerelemente an diesen vorbeiströmen zu lassen, wobei sich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung die Zellen trotzdem an der Oberfläche der Trägerelemente anlagern.

Die spezifischste Wechselwirkung der Zellen mit den Trägerelementen ist dadurch erreichbar, dass die Trägerelemente zum Fixieren der Zellen auf ihren Oberflächen für die jeweils zu fixierenden Zellen spezifische Antikörper tragen. Der Vorteil einer derartigen Ausbildung der Trägerelemente zeigt sich darin, dass die Antikörper so gewählt werden können, dass nur ganz bestimmte Zellen aus der Zellsuspension auf der Oberfläche der Trägerelemente angelagert werden. Damit hat man die Möglichkeit, selbst bei Zellsuspensionen, die mehrere Sorten von Zellen enthalten, nur die jeweils gewünschte Zellsorte auf der Oberfläche der Trägerelemente anzulagern, ohne dass die übrigen, in der Zellsuspension

- 18 -

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 18 -

noch vorkommenden Zellsorten einen störenden Einfluss ausüben. Des weiteren ist eine Verminderung der Belegungsdichte durch eventuell in der Zellsuspension enthaltene Schmutzpartikel vollständig ausgeschlossen, da die Antikörper mit diesen in keinem Fall wechselwirken. Die Antikörper-Zelle-Wechselwirkung kann sogar so spezifisch sein, dass nur lebende und lebensfähige Zellen auf den Trägerelementen fixiert werden und bereits Zellen, die kurz vor dem Absterben oder bereits abgestorben sind, durch die Antikörper nicht mehr gebunden werden. Des weiteren kann auch, wie bereits beim Ionenaustauschermaterial, das Auftragen der Zellen auf die Oberfläche der Trägerelemente zum einen durch Durchströmen der Trägerlemente erfolgen, wobei diese dann aus porösem Material hergestellt sein müssen, das jedoch eine Porengrösse haben kann, die weit grösser ist als der Durchmesser der Zelle, so dass auch hier eine Verminderung der Belegungsdichte durch auf den Oberflächen angelagerte Schmutzpartikel wesentlich geringer ist. Zum anderen kann die Zellsuspension parallel zur Oberfläche der Trägerelemente strömen, so dass die sich längs der Oberfläche bewegendenden Zellen durch die Antikörper eingefangen werden.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung sind Gegenstand der folgenden Beschreibung sowie der zeichnerischen Darstellung einiger Ausführungsformen der Erfindung. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1 eine teilweise aufgebrochene Seitenansicht
des ersten Ausführungsbeispiels der erfindungs-
gemässen Vorrichtung;

Fig.1a einen Ausschnitt im Bereich A in Fig.1;

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 19 -

Fig. 2 eine perspektivische Frontansicht
einer Halterung gemäss Fig. 1;

Fig. 3 ein Aufbringen von Zellen auf ein Träger-
element gemäss einem Ausführungsbeispiel
des erfindungsgemässen Verfahrens und

Fig. 4 eine Ansicht eines zweiten Ausführungsbei-
spiels entsprechend Fig. 1.

Ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemässen Vorrichtung in Fig. 1 zeigt im einzelnen eine verstellbare Haltevorrichtung 10, welche zwei einander gegenüberstehende Aufnahmeteile 12 und 14 umfasst, wobei das Aufnahmeteil 14 direkt an einer Grundplatte 16 gehalten ist und senkrecht von dieser absteht und das Aufnahmeteil 12 seinerseits an einem Schlitten 18 befestigt ist, welcher auf einer auf der Grundplatte 16 angeordneten Führung 20 verschieblich gelagert ist. Auf einer dem Aufnahmeteil 14 entgegengesetzten Seite trägt die Grundplatte 16 noch eine ebenfalls in gleicher Richtung wie das Aufnahmeteil 14 senkrecht von dieser abstehende Platte 22, an welcher ein Gehäuse 24 einer Mikrometerschraube 26 gehalten ist.

Die Mikrometerschraube 26 dient zur definierten Verschiebung des Schlittens 18 auf der Führung 20, wozu ein Verschiebebolzen 28 der Mikrometerschraube 26 auf den Schlitten 18 wirkt und mit diesem zumindest bezüglich seiner Verschieberichtung fest verbunden ist.

An jedem der einander gegenüberstehenden Aufnahmeteile 12 und 14 ist jeweils eine von zwei einander gegenüberliegenden Halterungen 30 und 32 befestigt. Diese Halterungen 30

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 20 -

und 32 tragen auf einanderzugewandten Seiten parallel zueinander verlaufende Elektroden 34 und 36, die so ausgerichtet sind, dass sie senkrecht zu einer Verschieberichtung 38 des Schlittens 18 verlaufen, wobei diese Verschieberichtung 38 im allgemeinen parallel zur Grundplatte 16 verläuft.

Vorteilhafterweise umfasst jede der Halterungen 30 und 32 einen Trichter 40 bzw. 42, welcher eine grosse Öffnung 44 bzw. 46 und eine kleine Öffnung 48 bzw. 50 besitzt. Die grosse Öffnung 44 bzw. 46 ist mit einem zylindrischen Flansch 52 bzw. 54 versehen, an welchem die den Trichter 40 bzw. 42 abdeckende Elektrode 34 bzw. 36 gehalten ist. Eine Zylinderachse des Flansches 52 bzw. 54 verläuft parallel zur Verschieberichtung 38. Des weiteren ist die kleine Öffnung 48 bzw. 50 mit einer Olive 56 bzw. 58 ausgerüstet, auf die jeweils ein Saugschlauch 60 bzw. 62 aufsteckbar ist. Dieser steht wiederum mit einer Pumpe 64 bzw. 66 in Verbindung, so dass folglich durch diese Pumpen 64 bzw. 66 in einem Inneren einer jeden der Halterungen 30 und 32 ein Unterdruck erzeugbar ist.

Die beiden mit einer Oberfläche parallel zueinander verlaufenden und senkrecht zu dieser Oberfläche durch die Mikrometerschraube 26 verschiebbaren Elektroden 34 und 36 sind jeweils mit einem Trägerelement 68 bzw. 70 überzogen, welches über die jeweilige Elektrode 34 bzw. 36 übersteht und zusätzlich noch auf einer Aussenseite des senkrecht zu der Elektrode 34 bzw. 36 verlaufenden zylindrischen Flansches 52 bzw. 54 überlappend anliegt. Zur Fixierung des Trägerelements 68, 70 ist dieser Flansch 52 bzw. 54 mit einer Ringnut 72 versehen, in welchen ein diese

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 21 -

Ringnut 72 überlappender Teil des Trägerelements 68 bzw. 70 durch einen auf dem Trägerelement 68 bzw. 70 aufliegenden Elastomerring 76 bzw. 78 gedrückt ist (Fig.1a).

Das Trägerelement 68 bzw. 70 dient zur Fixierung von zu fusionierenden Zellen 80 (Fig. 2). Bei dem ersten Ausführungsbeispiel ist vorgesehen, dass ein Aufbringen der Zellen 80 durch Hindurchsaugen einer Zellsuspension 84 durch das jeweilige Trägerelement 68 bzw. 70 erfolgt (Fig.3). Dazu müssen die Elektroden 34 bzw. 36 perforiert ausgebildet sein und die darauf aufliegenden Trägerelemente 68 bzw. 70 ebenfalls aus einem flüssigkeitsdurchlässigen Material bestehen. Bevorzugterweise wird, wie in Fig. 2 dargestellt, für die Trägerelemente 68 und 70 ein poröses Filtermaterial verwendet und die darunterliegenden Elektroden 34 bzw. 36 sind aus einem Drahtgeflecht hergestellt. Somit kann durch Evakuieren eines Inneren der Halterung 30 bzw. der Halterung 32 ein Flüssigkeitsstrom sowohl durch das jeweilige Trägerelement 68 bzw. 70 sowie durch die Elektrode 34 bzw. 36 in das Innere der Halterung 30 bzw. 32 erzeugt werden, wobei die in der Zellsuspension 84 enthaltenen Zellen sich auf einer der jeweiligen Elektrode 34 bzw. 36 abgewandten Oberfläche 86 bzw. 88 des jeweiligen Trägerelements 68 bzw. 70 anlagern und entsprechend den eingangs beschriebenen Möglichkeiten fixiert werden.

Ein derartiges Aufbringen der Zellen auf die Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 kann beispielsweise in einer in Fig. 3 dargestellten Vorrichtung erfolgen, wozu die jeweilige Halterung 30 bzw. 32 aus dem entsprechenden Aufnahmeteil 12 bzw. 14 gelöst und in ein Gefäß 90

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 22 -

mit einem Bad der Zellsuspension 84 eingetaucht wird. Gleichzeitig wird über die an der jeweiligen Halterung 30 bzw. 32 über den Saugschlauch 60 bzw. 62 angeschlossene Pumpe 64 bzw. 66 ein Unterdruck im Innern der Halterung 30 bzw. 32 erzeugt, so dass die Flüssigkeit der Zellsuspension 84 in der beschriebenen Weise durch das Trägerelement 68 bzw. 70 sowie die Elektrode 34 bzw. 36 hindurchströmt.

Sobald die Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 jeweils mit einer Schicht von Zellen 80 belegt sind, werden die Halterungen 30 und 32 in die vorgesehenen Aufnahmeteile 12 und 14 der Haltevorrichtung 10 eingesetzt und mit diesen Verbunden.

Hierbei ist ein Abstand zwischen den Aufnahmeteilen 12 und 14 derart zu wählen, dass die Oberflächen 86 und 88 einen grossen Abstand voneinander aufweisen und vor allem die Halterungen 30 und 32 bequem in die Aufnahmeteile 12 und 14 einsetzbar sind. Nach Fixieren der Halterungen 30 und 32 wird durch Drehen der Mikrometerschraube 26 der Schlitten 18 auf der Führung 20 in Verschieberichtung 38 verschoben, so dass die Oberflächen 86 und 88 der beiden Trägerelemente 68 und 70 aufeinanderzu bewegt werden. Je nach dem beabsichtigten Verfahren der Zellfusion werden die beiden Oberflächen 86 und 88 so lange verschoben bis sie einander berühren, oder es ist zumindest eine der Oberflächen 86 und 88 mit Abstandshaltern 92 versehen, welche das Zusammenführen der beiden Oberflächen 86 und 88 nur bis auf einen durch die Dicke der Abstandshalter 92 definierten Abstand ermöglichen. Diese Abstandshalter 92 werden vor allem dann eingesetzt,

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 23 -

wenn die Paare von Zellen nach einem Zusammenführen der Oberflächen 86 und 88 auf mechanische Art und Weise vollends durch Dielektrophorese gebildet werden.

Zur Erzeugung eines für die Dielektrophorese erforderlichen Wechselfeldes sowie zur späteren Applikation der Fusionsimpulse sind die beiden Elektroden 34 und 36 über elektrische Leitungen 94 und 96 mit einem Spannungsgenerator 98 verbunden, der sowohl in der Lage ist, das für die Dielektrophorese erforderliche Feld wie auch die für die Fusion notwendigen Feldimpulse zu erzeugen, wobei selbstverständlich bei vollständigem Zusammenführen der Oberflächen 86 und 88 für die Dielektrophorese kein Feld mehr angelegt werden muss, sondern sofort die Fusionsimpulse appliziert werden können.

Ein zweites Ausführungsbeispiel der erfindungsgemässen Vorrichtung, dargestellt in Fig. 4, besitzt im wesentlichen dieselben Teile, welche auch mit denselben Bezugszeichen wie beim ersten Ausführungsbeispiel versehen sind und daher nicht mehr gesondert beschrieben werden.

Zusätzlich ist bei dieser Vorrichtung noch an den Aufnahmeteilen 12 und 14 jeweils eine die Halterungen 30 bzw. 32 umgebende Spule 100 bzw. 102 vorgesehen, welche vorzugsweise einen Innendurchmesser aufweist, der grösser als ein grösster Durchmesser der jeweiligen Halterung 30 bzw. 32. Diese Spulen sind so dimensioniert, dass sie vorzugsweise ein magnetisches Feld erzeugen, dessen Feldlinien ungefähr senkrecht auf den Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 stehen.

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 24 -

Zur Stromversorgung der Spulen 100 und 102 ist noch ein Stromversorgungsgerät 104 vorgesehen, welches über jeweils zwei Leitungen 106 und 108 mit den Spulen 100 bzw. 102 verbunden ist und den für die Erzeugung einer ausreichend grossen Feldstärke notwendigen Strom liefert.

Das zweite Ausführungsbeispiel der erfindungsgemässen Vorrichtung erlaubt somit, sämtliche der eingangs beschriebenen Verfahren zum Zusammenführen der Zellen, d.h. zur Bildung von Zellpaaren anzuwenden.

Es ist möglich, die beiden Oberflächen 86 und 88 nicht mit den Abstandshaltern 92 zu versehen, so dass sie durch die Mikrometerschraube 26 dicht aneinander angelegt werden und dadurch mechanisch Paare von Zellen entstehen.

Es ist aber ebenfalls möglich, die beiden Oberflächen 86 und 88 nur bis zu den durch die Abstandshalter 92 vorgegebenen Abstand zusammenzuführen, so dass dieser Abstand bevorzugterweise dem Durchmesser mehrerer Zellen entspricht, jedoch so gering ist, dass ein jeweils auf einer der Oberflächen 86 und 88 haftender Flüssigkeitsfilm ausreicht, um eine durchgehende Flüssigkeitsschicht zwischen den zusammengeführten Oberflächen 86 und 88 zu bilden, die aufgrund der Kapillarkwirkung zwischen diesen Oberflächen gehalten wird und in welcher die Zellen beim Zusammenführen mittels Dielektrophorese oder mittels magnetischer Felder aufeinander zu schwimmen können.

Je nach dem, ob nun nach dem Zusammenführen der Oberflächen 86 und 88 ein elektrisches Wechselfeld für die Dielek-

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 25 -

trophorese angelegt wird, oder ob mittels der Spulen 100 und 102 ein Magnetfeld erzeugt wird, werden die Zellen vor Applikation des Fusionsimpulses durch den Spannungsgenerator 98 entweder durch ein elektrisches Feld oder durch ein magnetisches Feld zu Paaren zusammengeführt.

Bei Verwendung magnetischer Felder ist es selbstverständlich, dass die Materialien für die Halterungen 30 und 32 so gewählt werden müssen, dass sie für das Magnetfeld durchlässig sind. Die Elektroden 34 und 36, die notwendigerweise aus einem elektrisch leitenden Material bestehen müssen, können dabei entweder selbst aus einem ferromagnetischen Material hergestellt sein oder es genügt, wenn diese eine ausreichende Zahl von Perforationen aufweisen, durch welche das magnetische Feld hindurchtreten kann.

Zum Entfernen der fusionierten Zellen von den Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 werden die beiden Oberflächen 86 und 88 wieder auseinandergeschoben und vorzugsweise die Halterungen 30 und 32 von den Aufnahmeteilen 12 und 14 gelöst und die Zellen durch Eintauchen der Halterungen 30 und 32 in eine Lösung abgespült, wobei selbstverständlich hierzu die Pumpen 64 und 66 nicht mehr benötigt werden.

Bei den folgenden, im Detail beschriebenen Ausführungsbeispielen des erfindungsgemässen Verfahrens werden jeweils Hefezellen eines unterschiedlichen Typs, nämlich Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* AH 215 und des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* AH22, miteinander fusioniert, wobei jeweils eine der Oberflächen 86 und 88 mit Zellen des ersten Typs und die andere mit Zellen des zweiten Typs be-

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 26 -

legt wird. Dabei können für die Herstellung der Zellsuspensionen zwei unterschiedliche Lösungen verwendet werden.

Als erste, äusserst schwach leitende Lösung dient eine isotone Sorbitollösung, in welcher zusätzlich noch 0,1 mMol Calcium-Chlorid und 0,5 mMol Magnesium-Chlorid sowie 1 mg Albumin/ml enthalten sind. Das Albumin hat dabei nur die Aufgabe, eine elektrostatische Haftung der Zellen, beispielsweise an Gefässinnenflächen zu vermeiden.

Als zweite, stark leitende Lösung dient ebenfalls eine isotone Sorbitollösung, in welcher zu 0,1 mMol Calcium-Chlorid, 0,5 mMol Magnesium-Chlorid und 1 mg Albumin/ml noch zusätzlich 12 mMol KCl und 40 mMol NaCl zugesetzt sind, wobei relativ zur ersten Lösung die Konzentration des Sorbits geringer sein muss, um eine konstante Isoosmolarität zu gewährleisten.

Eine Zelldichte der Zellsuspension lag bei beiden verwendbaren Lösungen bei ungefähr 10^9 Zellen/ml.

Selbstverständlich wurden bei den folgenden Experimenten jeweils beide Zelltypen vor ihrem Aufbringen auf eine der Oberflächen 86 und 88 getrennt, jedoch in jeweils derselben Lösung, suspendiert, d.h. beide Typen in Lösung 1 oder beide Typen in Lösung 2.

1. Beispiel des Verfahrens

Hierbei dient als Trägerelement 68 und 70 jeweils ein Milliporefilter, dessen Porendurchmesser so gewählt wird, dass

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 27 -

er ungefähr dem Durchmesser der zu fusionierenden Zellen entspricht. Dies bedeutet bei den vorliegenden Hefezellen einen Porendurchmesser des Milliporefilters von 4 bis 6 μm . Die Fixierung der Zellen auf der Oberfläche 86 und 88 des jeweiligen Milliporefilters erfolgt somit durch Einlagerung der Zellen in den Poren, d.h. durch einen Formschluss.

Dazu wird, wie bereits beschrieben, jede der Halterungen 30 und 32 aus den Aufnahmeteilen 12 und 14 entnommen und jede der Halterungen 30 und 32 in ein Gefäß getaucht, in welchem der jeweilige zu fixierende Typ von Hefezellen in Form der Zellsuspension vorliegt. Durch Einschalten der Pumpen 64 und 66 wird die Lösung durch das als Trägerelement 68 und 70 dienende Milliporefilter und auch durch die dahinterliegende Elektrode 34 bzw. 36 hindurchgesaugt, wobei die auf den Oberflächen 86 bzw. 88 auftreffenden Zellen sich in den Poren des Milliporefilters festsetzen. Das Hindurchsaugen der Lösung erfolgt so lange, bis sich der Strömungswiderstand merklich erhöht. Nun werden die beiden Halterungen 30 und 32 aus den Suspensionen entnommen und in das jeweils entsprechende Aufnahmeteil 12 bzw. 14 eingesetzt. Hierbei ist jedoch noch zu erwähnen, dass es bei der formschlüssigen Fixierung der Zellen auf den Oberflächen 86 und 88 vorteilhaft ist, auch nach dem Entnehmen der Halterungen 30 und 32 aus den jeweiligen Zellsuspensionen einen geringen Unterdruck im Innern der Halterungen 30 und 32 aufrecht zu erhalten, damit die darin stehende Lösung nicht durch die Elektroden 34 bzw. 36 und das darauf liegende Trägerelement 68 bzw. 70 nach aussen strömt und die in den Poren formschlüssig gehaltenen Zellen wieder von den Oberflächen 86 und 88 wegschwemmt. Aus diesem Grund wird der Unterdruck im

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 28 -

Innern der Halterungen 30 und 32 zum einen so gross gewählt, dass die Lösung im Innern nicht wieder zurückströmt, zum andern jedoch so klein, dass auf der jeweiligen Oberfläche 86 bzw. 88 noch ein ausreichend dicker Flüssigkeitsfilm bestehen bleibt und vor allem nach dem Entfernen der Halterungen 30 und 32 aus den Zellsuspensionen keine Luft durch die Milliporefilter hindurchgesaugt wird.

Das Zusammenführen der mit Zellen belegten Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 kann, wie bereits vorstehend erläutert wurde, auf verschiedene Art und Weise erfolgen:

a) Mechanisches Zusammenführen

Hierzu werden mittels der Mikrometerschraube 26 die beiden Oberflächen 86 und 88 mechanisch bis auf ungefähr 1 μm zusammengeschoben. Dieser Abstand kann beispielsweise durch ein Objekt-Mikrometer bestimmt und kontrolliert werden.

Damit stehen die beiden Typen von Hefezellen, von denen der eine auf der Oberfläche 86 und der andere auf der Oberfläche 88 fixiert ist, in Membrankontakt miteinander und es müssen nur noch mittels des Spannungsgenerators 98 zwei Fusionsimpulse im Abstand voneinander von ungefähr 0,5 Sekunden appliziert werden. Die Fusionsimpulse haben eine Dauer von 10 μsec und eine Feldstärke und eine Feldstärke von 10 kV/cm.

Bei Raumtemperatur (ungefähr 24°C) können die beiden Oberflächen 86 und 88 nach ungefähr einer Ausheilzeitspanne der Zellen von 10 Minuten durch Drehen der

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 29 -

Mikrometerschraube 26 voneinander getrennt werden. Die Halterungen 30 und 32 werden dann wiederum aus den Aufnahmeteilen 12 und 14 entnommen und in einem bekannten Wachstumsmedium für die Fusionsprodukte von den Trägerelementen 68 und 70, d.h. in diesem Falle den Milliporefiltern abgewaschen. Nach Anziehen der fusionierten Hybridzellen in dem Wachstumsmedium werden diese kloniert und dann weiter auf Agar gezogen. Das Wachstumsmedium sowie das Klonieren und weitere Anziehen der Hybride ist ausführlich in der Publikation von Schnettler et al. (Schnettler, Zimmermann und Emeis, FEMS Letters 24, (1984) Seite 81-85) beschrieben.

Nach ungefähr zweiwöchigem Anziehen der fusionierten Zellen konnte bei Verwendung der Lösung 1 eine Ausbeute von ungefähr 5000 Hybriden und bei Verwendung der Lösung 2, d.h. der leitenden, einer physiologischen Konzentration ähnlicheren Lösung, etwa 6000 bis 7000 Hybride gezählt werden.

Eine Wärmeentwicklung bei Verwendung der leitenden Lösung konnte nicht beobachtet werden, da die Fusionsimpulse sehr kurz sind, so dass in der Lösung eine elektrische Leitung durch die Ionen, die zu einer Wärmeentwicklung führt, nur in unwesentlichem Umfang eintritt.

b) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit Dielektrophorese

Das Belegen der Oberflächen 86 und 88 der Trägerelemente 68 und 70 erfolgte identisch wie bei a), die Oberflächen

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 30 -

86 und 88 wurden mechanisch, jedoch nur bis zu einem Abstand von ungefähr 20 μm zusammengeführt. Hierzu konnten, wie bereits beschrieben, Abstandshalter 92 mit einer Dicke von 20 μm verwendet werden. Durch die sich zwischen den Oberflächen 86 und 88 bildende Schicht aus der ursprünglichen Lösung können die Zellen bei Anlegen eines für die Dielektrophorese üblichen elektrischen Wechselfeldes aufeinanderzu bewegt werden, wobei eine der ein Paar bildenden Zellen aus ihrer Oberfläche herausgelöst wird, was jedoch bei den formschlüssig in den Poren des Milliporefilters sitzenden Zellen problemlos erfolgen kann. Das Wechselfeld für die Dielektrophorese wurde 10 Sekunden lang angelegt, wobei die Feldstärke 3 kV/cm betrug. Anschliessend wurden die beiden Fusionsimpulse mit einer Feldstärke von 10 kV/cm und einer Pulslänge von 10 μsec im Abstand von 0,5 Sekunden appliziert. Für die Herstellung der Zellsuspension konnte wie bei a) ebenfalls die Lösung 1 oder die Lösung 2 verwendet werden. Die Verwendung einer elektrisch stark leitenden Lösung auch bei Dielektrophorese ist deshalb möglich, weil die Zellen nur über eine sehr kleine Distanz von in diesem Fall 20 μm aufeinanderzu bewegt werden müssen, so dass das Wechselfeld nur für eine kurze Zeitspanne anzulegen ist und daher auch keine sehr grosse Erwärmung auch bei leitender Lösung auftritt.

Das Entfernen der Fusionsprodukte von den Oberflächen 86 und 88 sowie das Anziehen der Hybride erfolgt wie bei a).

Die Ausbeute betrug bei Lösung 1 ungefähr 5800 Hybride und bei Lösung 2 etwa 6500.

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

c) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit einem Zusammenführen durch magnetische Felder

Auch bei diesem Ausführungsbeispiel können dieselben Lösungen, d.h. Lösung 1 und Lösung 2, wie bei a) verwendet werden. Damit die Zellen jedoch durch magnetische Felder aufeinanderzu bewegbar sind, sind die Membranen der Hefezellen vorher mit magnetischen Teilchen zu versehen. Hierzu wird der Zellsuspension ein $\mu\text{g/ml}$ Poylysin zugegeben, durch welches ebenfalls zugegebene Teilchen aus Magnetit (Mischung aus Fe_2O_3 und Fe_3O_4), im Handel unter der Bezeichnung Ferrofluid zu erwerben, auf einer Oberfläche der Membran der Hefezellen gebunden werden.

Das Belegen der Membran mit Zellen erfolgt wie bei den vorher beschriebenen Ausführungsbeispielen und die Oberflächen 86 und 88 werden wie bei b) bis auf eine Distanz von $20 \mu\text{m}$ einander angenähert.

Durch Anlegen eines Magnetfeldes werden die Zellen, wie bei der Dielektrophorese, von einer der Oberflächen 86 oder 88 abgelöst und aufeinanderzu bewegt.

Die Fusion der Zellen sowie das spätere Ablösen von den Oberflächen 86 und 88 erfolgt wie bereits unter a) und b) beschrieben.

Bei Verwendung der genannten Lösungen wurden Ausbeuten von ungefähr 2500 Hybriden erreicht.

A 46 320 b
20.Dezember 1984
x-35

- 32 -

2.Beispiel des Verfahrens

Die Trägerelemente 68 und 70 sind bei diesem Ausführungsbeispiel als poröse Ionenaustauschermembran ausgebildet, wobei es sich bevorzugterweise um einen Kationenaustauscher handelt, welcher in der Lage ist, an den Oberflächen 86 und 88 positiv geladene Teilchen elektrostatisch zu binden.

Das Belegen der Oberflächen 86 und 88 erfolgt wie bei den bisher beschriebenen Ausführungsbeispielen ebenfalls durch Hindurchsaugen der Lösung durch die jeweiligen Trägerelemente 68 und 70 sowie die Elektroden 34 und 36 in das Innere der Halterungen 30 und 32 mittels der Pumpen 64 und 66. Als Lösungen werden wie bei den bisher beschriebenen Ausführungsbeispielen ebenfalls die Lösungen 1 und 2 verwendet. Die Suspensionsdichte wird dabei so eingestellt, dass auf den Oberflächen 86 und 88 eine einlagige Schicht von Zellen entsteht. Die Stärke der elektrostatischen Bindung der Zellen auf den Oberflächen 86 und 88 der Ionenaustauschermembran kann durch Variation des pH-Wertes in der Zellsuspension entsprechend eingestellt werden.

a) Mechanisches Zusammenführen

Hierzu werden, wie unter a) des ersten Beispiels beschrieben, die Oberflächen 86 und 88 bis auf einen Abstand von ungefähr 1 μm aufeinanderzu bewegt, so dass die Zellen miteinander in Membrankontakt kommen. Da die Zellen zur Bildung der Paare weder von der Oberfläche 86, noch von der Oberfläche 88 abgelöst werden müssen, kann die

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 33 -

Bindung der Zellen an diese Oberflächen sehr gut sein, so dass in den Lösungen zunächst mit einem pH-Wert von ungefähr 7 gearbeitet werden kann. Nach Applikation der Fusionsimpulse mit derselben Stärke wie bei den bisherigen Ausführungsbeispielen wird ebenfalls wieder das Ausheilen der Zellmembran abgewartet und anschliessend die beiden Oberflächen 86 und 88 voneinander entfernt.

Um im folgenden die Zellen von den Oberflächen 86 und 88 leicht abspülen oder abwaschen zu können, wird ein Nährmedium mit einem pH-Wert verwendet, der ungefähr bei 6 liegt. Ein derart erniedrigter pH-Wert führt dazu, dass sich auf dem Ionenaustauschermaterial Protonen anlagern, welche die Bindungen zwischen den Zellen und der Kationenaustauschermembran lösen, so dass sich diese leichter entfernen lassen. Das Klonieren und Anziehen der Zellen erfolgt wie bei den bisherigen Ausführungsbeispielen. Als Ausbeute werden ungefähr 7700 Hybride gezählt.

b) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit Dielektrophorese

Die Verfahrensführung erfolgt wie bei b) des ersten Ausführungsbeispiels, mit dem einzigen Unterschied, dass in diesem Fall der pH-Wert der Lösung 1 oder der Lösung 2 so eingestellt werden muss, dass die Zellen von den Oberflächen 86 und 88 durch das elektrische Feld abgelöst werden können, da ansonsten ein Zusammenführen der Zellen zu Paaren nicht möglich wäre. Nach dem üblichen Klonieren und Anziehen der Zellen erhält man eine Ausbeute von 6300 Hybriden.

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 34 -

c) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit einem
Zusammenführen durch Magnetfeld

Auch hier ist der pH-Wert so einzustellen, dass die Zellen durch das angelegte Magnetfeld von dem jeweiligen Ionenaustauschermaterial auf der Oberfläche 86 oder 88 abgelöst und zusammengeführt werden können. Die Verfahrensführung erfolgt ansonsten genau wie bei c) des ersten Ausführungsbeispiels. Die Ausbeute beträgt ungefähr 3200 Hybride.

3. Beispiel des Verfahrens

Bei diesem Beispiel wird als Trägerelement 68 und 70 ein poröses Material verwendet, welches auf seinen Oberflächen 86 und 88 mit Antikörpern versehen ist, welche durch Glutaldehyd an dem jeweils verwendeten Trägerelement 68 oder 70 gebunden sind. Bevorzugterweise wird als Trägerelement ein poröses Filtermaterial verwendet, welches jedoch hinsichtlich seiner Porengrösse keinen Beschränkungen unterliegt, so dass bevorzugterweise ein Material mit grösseren Poren verwendet wird, so dass sich auf den Oberflächen 86 und 88 beim Hindurchsaugen der Lösung möglichst wenig Schmutzpartikel absetzen.

Die Herstellung derartiger Antikörper entspricht den bisher üblichen Verfahren und wird beispielsweise in dem Artikel von

ausführlich beschrieben.

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 35 -

a) Mechanisches Zusammenführen

Die Verfahrensführung erfolgt wie unter a) im ersten oder im zweiten Ausführungsbeispiel beschrieben, wobei ebenfalls die Lösungen 1 oder 2 Verwendung finden können.

Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Zelle nach der Fusion mitsamt den Trägerelementen 68, 70, a welchen sie noch haften, in das Nährmedium gebracht w Hierin können sich die noch an den Trägerelementen 68 und 70 haftenden Zellen teilen. Nach 1 bis 2 Tagen werden die Trägerelemente 68 und 70 sorgfältig ausgewaschen und die Lösung dann abzentrifugiert, wobei hauptsächlich die durch Teilung entstandenen Tochterzellen von den Trägerelementen 68 und 70 abgelöst werden.

Das Klonieren der erhaltenen Tochterzellen erfolgt dann wie bei Schnettler et al. beschrieben.

Die Ausbeute der erhaltenen Hybride liegt bei ungefähr 5000 bis 6000.

b) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit Dielektrophorese

Hierbei wird ebenfalls wie unter b) bei den Beispielen 1 und 2 beschrieben, verfahren.

Hinzuzufügen ist, dass zum Durchführen der Dielektrophorese auch die Bindung zwischen den Zellen und den Antikörpern nur so stark sein darf, dass die Zellen bei der Dielektrophorese zumindest von einer der Oberflächen 86 und 88 abgelöst und auf die gegenüberliegende Oberfläche gebracht

A 46 320 b
20. Dezember 1984
x-35

- 36 -

werden können. Die Auswahl der Antikörper mit der entsprechenden Bindungsstärke erfolgt durch gezielte Selektion der Antikörper vor ihrem Aufbringen auf die Träger-elemente 68 und 70.

Die Ausbeute an Hybriden beträgt ungefähr 5000.

c) Mechanisches Zusammenführen in Kombination mit Zusammenführen unter Verwendung von Magnetfeldern

Hierbei wird ebenfalls wie unter c) bei den bereits beschriebenen Beispielen 1 und 2 verfahren, wobei ebenfalls wie bei b) des dritten Ausführungsbeispiels die Stärke der Bindung zwischen Zellen und Antikörpern so sein muss, dass die Zellen durch das Magnetfeld zumindest von einer der Oberflächen 86 und 88 gelöst werden können, wobei die Selektion der Antikörper wie oben beschrieben erfolgt.

Die Ausbeute an Hybriden beträgt ungefähr 2000.

Fig.1

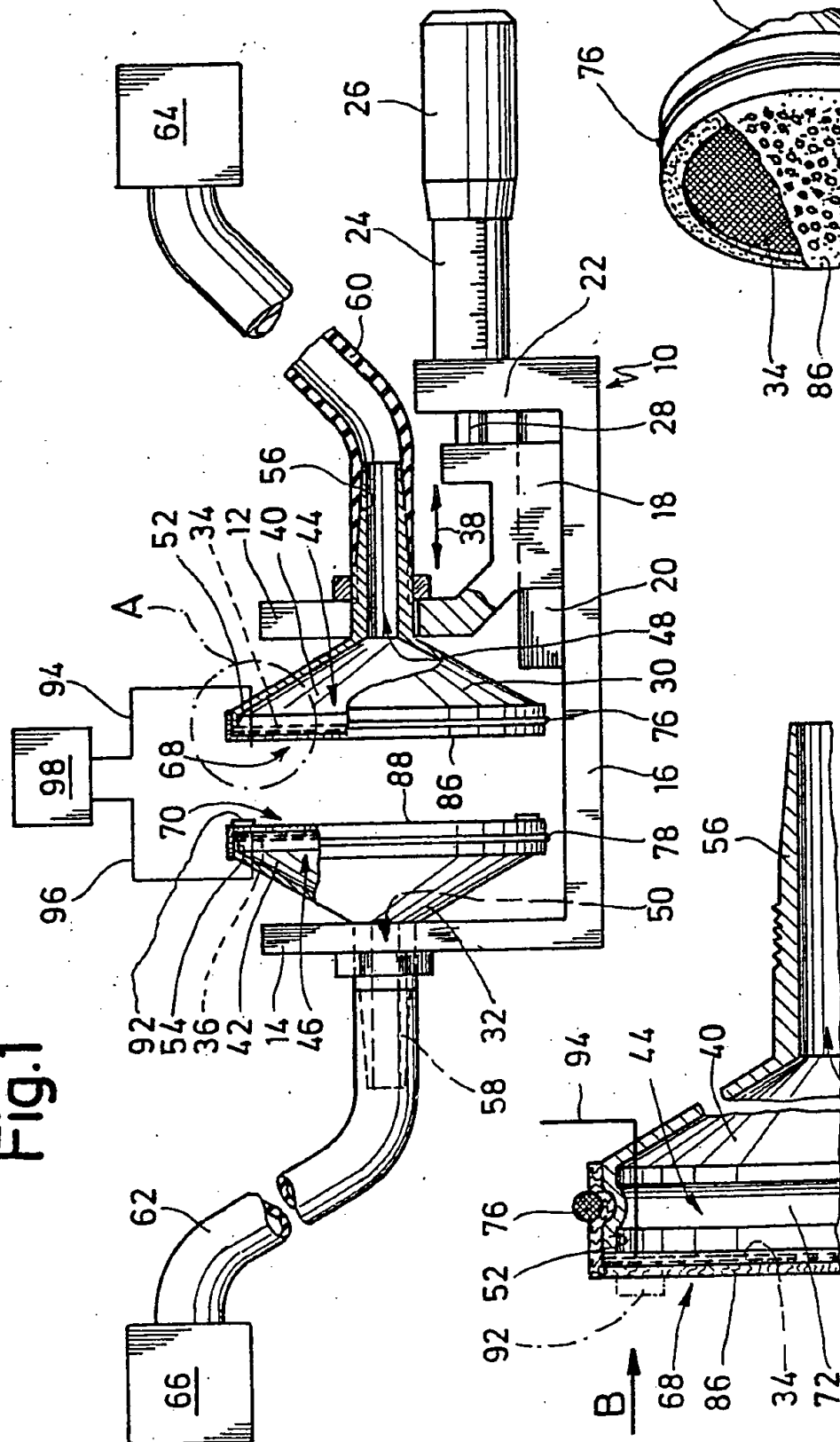


Fig.1a

Fig.2

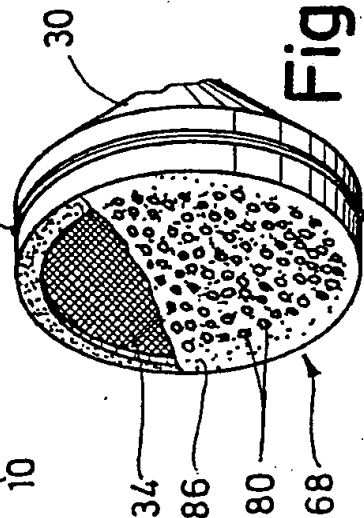


Fig. 3

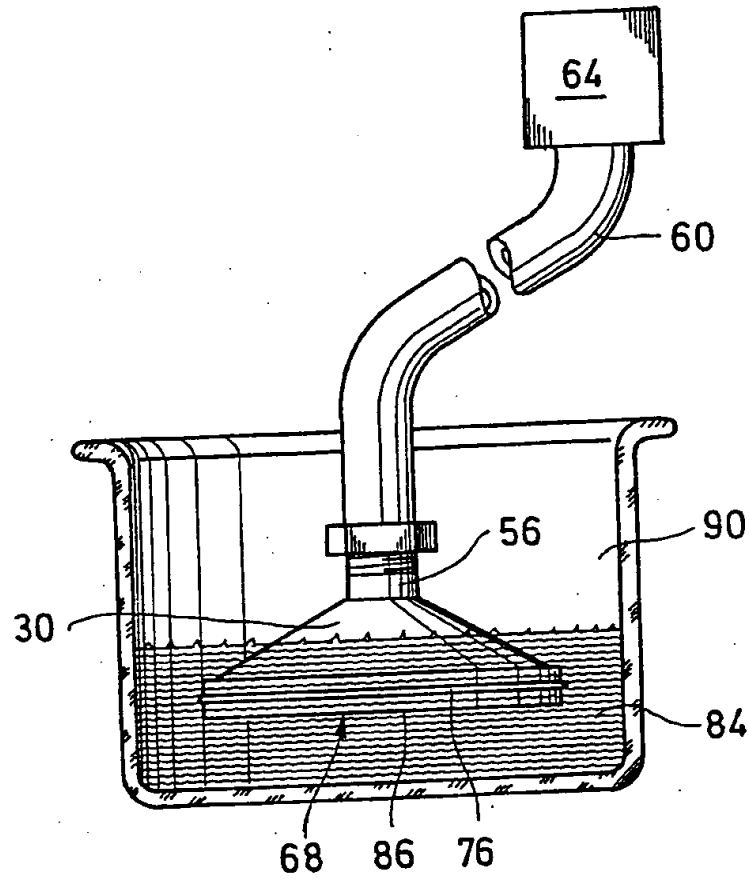


Fig. 4

